

Tumervakzine für MUC1-positive Karzinome

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neuartige Tumervakzinen auf der Grundlage der Molekülstruktur des menschlichen epithelialen Muzins (MUC1). Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Immuntherapie von Karzinomen.

Epitheliale Muzine sind Glykoproteine mit repetitiven Aminosäuresequenzen und einem hohen Kohlenhydratanteil, die teils membrangebunden sind, teils sezerniert werden und auf vielen Drüsenepithelien vorkommen. Das am besten bekannte epitheliale Muzin ist das membrangebundene MUC1, auch als PEM, PUM, EMA, MAM-6, PAS-O oder Episialin beschrieben (Finn, O., et al., Immunol.Reviews 145:61, 1995), dessen extrazellulärer Teil aus einer variablen Anzahl sich wiederholender Einheiten aus 20 Aminosäuren besteht, den sogenannten "Tandem-Repeats". Das MUC1 ist an sich kein tumorspezifisches Molekül; seine Eignung als Tumorentigen beruht darauf, daß sein Kohlenhydratanteil bei Tumoren qualitativ und quantitativ verändert ist (Burchell, J., und Taylor-Papadimitriou, J., Epith.Cell Biol. 2:155, 1993). Dabei treten neue Epitope auf, die vom Immunsystem (humorale und zelluläre Abwehr) wahrgenommen werden.

Nach operativer Entfernung des Primärtumors (bzw. nach Strahlen- oder Chemotherapie) muß in der Regel davon ausgegangen werden, daß noch Tumorzellen im Körper verbleiben ("minimal residual disease"). Diese Tumorzellen, die eine potentielle Gefahr darstellen, werden durch verschiedene körpereigene Mechanismen bekämpft, deren Wirksamkeit durch eine adjuvante Immuntherapie verstärkt werden kann. Die effektivste adjuvante Immuntherapie ist die Vakzinierung. Zwei Voraussetzungen sind hierfür erforderlich: erstens, daß ein geeignetes Zielantigen (Epitop) auf den Tumorzellen vorhanden ist, und zweitens, daß es gelingt, eine möglichst stark immunogene, vorzugsweise synthetische Form einer Vakzine herzustellen.

Nicht-glykosylierte Oligo-Repeat-Peptide des MUC1 stellen ein geeignetes Zielantigen bei einer Reihe häufiger Karzinome dar (Apostolopoulos, V., und McKenzie, I.F.C., Crit.Rev.Immunol. 14:293, 1994). Die immundominante Region des MUC1 ist das Motiv PDTRPAP, das auf jedem Tandem-Repeat vorhanden ist. Bisherige Versuche, eine Vakzine auf der Basis eines einzelnen Tandem-Repeats zu entwickeln, waren jedoch nicht erfolgreich. Nach dem bisherigen Stand des Wissens ist für das Zustandekommen der immunogenen Konformation des Peptids eine Mindestlänge des Peptids erforderlich, die erst bei 3-5 Tandem-Repeats erreicht wird (Fontenot, J.D., et al., J.Biomol.Struct.Dyn. 13:245, 1995).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, auf der Basis der Molekülstruktur des menschlichen epithelialen Mucins MUC1 eine Tumorstoffvakzine zu entwickeln, die insbesondere zur Bekämpfung von nach anderen Therapien im Körper noch verbliebenen Tumorzellen geeignet ist.

Bei der immunologischen Untersuchung synthetischer Glykopeptide, die einem Tandem-Repeat des MUC1 entsprechen, wurde überraschend gefunden, daß die Glykosylierung des Threonins innerhalb der immundominanten Region PDTRPAP mit α -GalNAc die Antigenität signifikant erhöht. Bisher war davon ausgegangen worden, daß diese Position bei nativem MUC1 nicht glykosyliert ist. Zu dieser Schlußfolgerung hatten die Annahme, daß eine Glykosylierung die Erkennung von Peptidepitopen in der Regel behindert, sowie Ergebnisse von in-vitro-Glykosylierungsversuchen (Stadie, T., et al., Eur.J.Biochem. 229: 140(1995)) geführt. Neueste Untersuchungen (Müller, S., et al., J.Biol.Chem. 272:24780, 1997) zeigen allerdings, daß das Threonin im PDTRPAP-Motiv in vivo sehr wohl glykosyliert sein kann. Aus den genannten neuen Ergebnissen wird geschlossen, daß die Antigenität (und im Zusammenhang damit auch die Immunogenität) des MUC1-Tandem-Repeats durch Glykosylierung des Thr im PDTRPAP-Motiv mittels GalNAc oder einem kurzen Oligosaccharid erheblich erhöht wird. Dadurch wird die immunogene Konformation der immundominanten Region bereits von

einem einzelnen Tandem-Repeat erreicht. Die Antigenität des glykosylierten PDTRPAP-Motivs in einem Monorepeat übertrifft sogar die des oligomeren, nicht glykosylierten Peptids. Auf der Basis dieser Entdeckung wird vorgeschlagen, Tumorstoffe verschiedener Molekülgrößen zu entwickeln, die am Thr des PDTRPAP-Motivs durch GalNAc oder ein geeignetes kurzkettiges Oligosaccharid glykosyliert sind. Die Aufgabe der Erfindung wird gemäß Anspruch 1 gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Die Erfindung soll nachstehend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Beispiel 1

Antigenität von synthetischen MUC1-abgeleiteten Glykopeptiden

Im folgenden wird die Bindung von monoklonalen Antikörpern gegen das immundominante Motiv PDTRPAP des epithelialen Muzins (MUC1) an synthetische Glykopeptide dieses Muzins mit einer Länge von 20 bzw. 21 Aminosäuren in einem Festphasen-Immunoassay (ELISA) untersucht. Die Glykopeptide mit den Bezeichnungen A1 bis A12 sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sie entsprechen einem überlappenden Tandem-Repeat des MUC1 und enthalten 5 potentielle Glykosylierungsstellen (3x Thr, 2x Ser); A1-A9 enthalten ein zusätzliches Ala. Die Glykopeptide unterscheiden sich in der Zahl und Position der Glykosylierungsstellen (siehe Tabelle 1). A1-A9 tragen als Glykane das Thomsen-Friedenreich-Antigen (TF) β -D-Gal(1-3) α -D-GalNAc-O-R, während A11 und A12 lediglich α -D-GalNAc-O-R (das Tn-Antigen) tragen. Die benutzten Antikörper sind: A76-A/C7 (Maus, IgG1, Epitop: APDTRPAP) und MF06 (Maus, IgG1, Epitop: DTRPAP) (siehe: Rye, P.D., Price, M.R., eds., ISOBM TD-4 International Workshop on Monoclonal Antibodies against MUC1, Tumor Biol. 19, Suppl.1, 1998).

Tabelle 1: Synthetische Glykopeptide; das Peptid entspricht der Grundstruktur des epithelialen Muzins (MUC1). Die immundominante Region ist unterstrichen.

A: Glykosylierung mit TF:

A--H--G--V--T--S--A--P--D--T--R--P--A--P--G--S--T--A--P--P--A
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Peptid # Glykosyliert in Position:

A1	5
A2	10
A3	17
A4	6
A5	16
A6	5, 17
A7	5, 16, 17
A8	5, 6, 16, 17
A9	5, 6, 10, 16, 17

B: Glykosylierung mit Tn:

H--G--V--T--S--A--P--D--T--R--P--A--P--G--S--T--A--P--P--A
 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Peptid # Glykosyliert in Position:

A11	5, 17
A12	5, 6, 10, 16, 17

Die Ergebnisse zeigen, daß die in Position 10 glykosylierten Peptide mit den beiden im Beispiel gezeigten Antikörpern signifikant stärker binden als Peptide, die an dieser Stelle nicht glykosyliert sind. Glykosylierungen an anderen Positionen sind ohne Einfluß. Substitution durch Tn oder TF ist gleichwertig. Das in diesem Beispiel demonstrierte Bindungsverhalten wird von anderen MUC1-Antikörpern geteilt; es gibt aber auch Ausnahmen. Die deutlich erhöhte Antigenität der in Position 10 glykosylierten Peptide läßt sich auch in Inhibitionsversuchen zeigen.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Glykosylierung der immundominanten Region des MUC1-Peptids mittels Tn oder TF die Antigenität signifikant erhöht.

amt
B. Patentansprüche

1. Tumorstakzine, enthaltend vom menschlichen epithelialen Muzin MUC1 abgeleitete synthetische Peptide unterschiedlicher Länge, die am Threonin der enthaltenen immundominanten Regionen PDTRPAP glykosyliert sind.
2. Tumorstakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die synthetischen Peptide eine Länge von > 20, vorzugsweise von 40-120 Aminosäuren, haben.
3. Tumorstakzine nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Glykosylierung durch Monosaccharide erfolgt.
4. Tumorstakzine nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Glykosylierung durch α N-Acetylgalactosamin (GalNAc) erfolgt.
5. Tumorstakzine nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Glykosylierung durch kurzkettige Oligosaccharide erfolgt.
6. Tumorstakzine nach Anspruch 1 bis 3 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Glykosylierung durch das Disaccharid Gal β -1,3-GalNAc α erfolgt.
7. Verwendung der Tumorstakzine nach Anspruch 1 bis 6 zur Bekämpfung von Tumorzellen aus Mamma-, colorectalen oder Pankreas-karzinomen im Sinne einer aktiven spezifischen Immunisierung.

Add A11 on
a separate page

Add A2

Add
C4